

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21620101152341

UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

# 三角梅核糖体失活蛋白的亲和层析法分离研究

**Separation of *Bougainvillea glabra* RIPs by Affinity  
Chromatography**

于月娇

指导教师姓名: 周涵韬 教授

张赛群 助理教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2013 年 6 月

论文答辩时间: 2013 年 12 月

学位授予日期:

答辩委员会主席:

评阅人:

年 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（）1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（）2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

# 目录

摘要 .....	I
ABSTRACT .....	III
第一章 前言 .....	1
1 核糖体失活蛋白的研究概况 .....	1
1.1 RIP 的研究历史 .....	1
1.2 RIPs 的分类与分布 .....	2
1.3 RIPs 的结构与功能 .....	6
1.4 RIPs 的酶活性 .....	9
1.5 RIPs 的生理功能和应用 .....	12
1.6 RIPs 在异源生物中的表达 .....	16
2 植物蛋白纯化技术 .....	18
2.1 常见的植物蛋白纯化技术 .....	18
2.2 免疫亲和色谱 (IAC) .....	20
2.3 核糖体失活蛋白的分离纯化 .....	21
3 三角梅和三角梅核糖体失活蛋白 .....	22
3.1 三角梅概况 .....	22
3.2 三角梅核糖体失活蛋白 .....	22
4 本研究的目的及意义 .....	23
5 研究内容与技术路线 .....	23
第二章 材料与方法 .....	25
1 实验材料与仪器 .....	25
1.1 主要材料 .....	25
1.2 主要试剂 .....	25
1.3 培养基 .....	26
1.4 实验仪器 .....	27

<b>2 方法</b>	<b>27</b>
2.1 三角梅叶片总 RNA 的提取及电泳检测	27
2.2 三角梅 Bouganin 基因的克隆	28
2.3 Bouganin 基因表达载体的构建	31
2.4 Bouganin 蛋白基因的诱导表达	33
2.5 Bouganin 蛋白对肿瘤细胞的抑制作用检测	36
2.6 抗体制备及效价检测	37
2.7 免疫亲和层析方法分离三角梅核糖体失活蛋白	40
<b>第三章 结果与分析</b>	<b>42</b>
1 三角梅总 RNA 的提取及电泳检测结果	42
2 三角梅 bouganin 基因的克隆	42
3 表达载体 pET28-a-bouganin 的构建	44
3.1 表达载体 pET-28a-Bouganin 的鉴定	44
3.2 表达载体中 Bouganin 片段的序列分析	44
4 Bouganin 基因在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的表达	47
4.1 Bouganin 基因在大肠杆菌中的表达结果	47
4.2 bouganin 蛋白的可溶性鉴定	48
4.3 诱导温度对重组蛋白可溶性的影响结果	48
4.4 目的蛋白的纯化结果	49
5 Bouganin 蛋白抗肿瘤活性的检测结果	50
6 抗体制备结果	52
6.1 ELISA 技术	52
6.2 抗体效价检测结果	53
6.3 光叶三角梅 Bouganin 蛋白的杂交结果	53
7 三角梅核糖体失活蛋白的分离纯化	54
<b>第四章 总结与展望</b>	<b>57</b>
<b>致谢</b>	<b>58</b>
<b>参考文献:</b>	<b>59</b>

# CATALOGUE

<b>ABSTRACT(Chinese)</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT(English)</b> .....	<b>III</b>
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Introduction of ribosome-inactivating proteins</b> .....	<b>1</b>
1.1 History of RIPs .....	1
1.2 Classification and distribution of RIPs .....	2
1.3 Structure and function of RIPs .....	6
1.4 Enzymetic activities of RIPs .....	9
1.5 Functions and applications of RIPs .....	12
1.6 Expression of RIPs in heterogenous organisms .....	16
<b>2 Purification technologies of plant proteins</b> .....	<b>18</b>
2.1 Common purification technologies of plant proteins .....	18
2.2 Immunoaffinity chromatography (IAC) .....	20
2.3 Separation and purification of RIPs .....	21
<b>3 <i>Bougainvillea</i> and its ribosome-inactivating proteins</b> .....	<b>22</b>
3.1 Introduction of <i>Bougainvillea</i> .....	22
3.2 The bouganin protein .....	22
<b>4 Purpose and meaning of this study</b> .....	<b>23</b>
<b>5 Main contents and technical route of this study</b> .....	<b>23</b>
<b>Chapter2 Materials and Methods</b> .....	<b>25</b>
<b>1 Materials and reagents</b> .....	<b>25</b>
1.1 Main materials .....	25
1.2 Main reagents .....	25
1.3 Mediums .....	26
1.4 Instruments .....	27
<b>2 Methods</b> .....	<b>27</b>

2.1 Total RNA extraction from <i>Bougainvillea</i> leaves .....	27
2.2 Cloning of <i>bouganin</i> gene .....	28
2.3 Construction of expression vector of <i>bouganin</i> gene .....	31
2.4 Expression of bouganin .....	33
2.5 Identification of the tumor-cell-inhibition of bouganin .....	36
2.6 Preparation of antibody and its titer test .....	37
2.7 Separation of bouganin by Immunoaffinity chromatography .....	40
<b>Chapter3 Results and Analysis .....</b>	<b>42</b>
1 Total RNA extraction and electrophoresis result .....	42
2 Cloning of <i>bouganin</i> gene .....	42
3 Construction of expression vector pET-28a-bouganin .....	44
3.1 Identification of pET-28a-bouganin .....	44
3.2 Sequence analysis of <i>bouganin</i> gene .....	44
4 Expression of bouganin in <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) .....	47
4.1 Expression result of <i>Bouganin</i> gene in <i>E.coli</i> BL21(DE3) .....	47
4.2 Solubility of bouganin protein .....	48
4.3 Effect of the inducing temperature on solubility of the recombinant protein .....	48
4.4 Purification result of the recombinant protein .....	49
5 Results of the anti-tumor activity of bouganin .....	50
6 Test of the prepared antibody .....	52
6.1 Introduction of ELISA .....	52
6.2 Results of the antibody titer .....	53
6.3 The WB result of the antibody and bouganin protein in <i>Bougainvillea</i> .....	53
7 Separation and purification of bouganin protein .....	54
<b>Chapter4 Discussion .....</b>	<b>57</b>
<b>References .....</b>	<b>58</b>
<b>References: .....</b>	<b>59</b>

## 摘要

核糖体失活蛋白 (Ribosome-inactivating protein, RIP) 是一类广泛存在于高等植物细胞中的能专门作用于真核细胞并损伤其核糖体功能的毒蛋白, 具有对肿瘤细胞、动物病毒以及对多种植物病毒 (如烟草花叶病毒 TMV、黄瓜花叶病毒 CMV、马铃薯 X 病毒 PVX、马铃薯 Y 病毒 PVY)、植物真菌病害 (如立枯病、白粉病、灰霉病等) 及昆虫 (如烟草天蛾, 稻飞虱, 棉铃虫) 等的抗性。因此, RIP 在医学和农业上应用潜力巨大。

RIPs 广泛存在于高等植物中, 而且在同种植物中具有丰富的多态性。多态性的发现对于追踪 RIPs 的起源及其功能的深入研究具有重要的意义。

1997 年 Bolongnesi 等首先从红花三角梅 *Bougainvillea spectabilis* Willd 中分离到一种核糖体失活蛋白, 命名为 Bouganin 蛋白; 研究表明 bouganin 属于 I 型 RIPs, 它不仅具有 N-糖苷酶活性, 而且它的一个显著特征是其对动物细胞或动物个体毒性非常低, 是目前所发现的毒性最低的 RIPs。

本实验室近年来对光叶三角梅 *B. glabra* Choisy 进行研究发现其 *bouganin* 基因具有很高的序列多态性, 推测其可能含有多态性的 Bouganin 蛋白。因此, 本研究以 *B. glabra* 为材料, 通过克隆同源序列进行体外表达制备抗体, 进行了亲和层析法分离纯化 *B. glabra* Choisy 中 Bouganin 蛋白的研究探索, 以期分离纯化多态性蛋白并分析其生物活性提供基础。本研究主要结果及结论如下:

1. 将克隆所得的 *Bouganin* 片段与 pET-28a 载体连接, 构建重组表达载体 pET-28a-bouganin 并导入大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 在 IPTG 诱导下获得重组 Bouganin 蛋白。重组蛋白诱导表达的最佳条件为 18℃, 160-180rpm 诱导 10h。

2. 重组 Bouganin 蛋白对肿瘤细胞 HepG-2, Hela 和 B-16 分别具有不同程度的抑制作用, 其  $IC_{50}$  分别为 873.9  $\mu$ g/ml, 562.6  $\mu$ g/ml 和 624.5  $\mu$ g/ml。重组 Bouganin 蛋白对肿瘤细胞的抑制作用表明在医学上将具有较高的应用价值。

3. 以获得的重组 Bouganin 蛋白为抗原制备多克隆抗体。ELISA 结果表明本次制备的抗体效价为 1:3200, 计算得亲和常数为  $5.8 \times 10^6$ , 略低于免疫亲和层析对抗体的亲和常数要求 ( $10^7$ - $10^{12}$ )。



4.将抗体作为配基与 CNBr-activated Sepharose 4B 凝胶偶联制备亲和层析柱，并对三角梅中的 Bouganin 蛋白进行分离，但可惜本实验未能成功分离到 Bouganin 蛋白。分析实验失败的原因可能是由于抗体效价过低，导致层析柱无法亲和到足量 Bouganin 蛋白；另外，组织提取液中 Bouganin 蛋白含量过低愈发降低了亲和柱的亲和效率。为证实此猜测，我们以纯化后的重组 Bouganin 蛋白为对照样品对亲和柱上样，发现与层析柱结合并得以收集的目的蛋白量很少，大部分蛋白则未能吸附至层析柱上而以杂蛋白形式流出，该结果也为我们的猜测提供了依据。

**关键词：**三角梅；核糖体失活蛋白；亲和层析

## ABSTRACT

Ribosome-inactivating protein is a kind of toxic proteins widely existed in higher plant cells that specially acts on eukaryotic cells and damages ribosomes. RIPs have a resistance to tumor cells, animal viruses and many plant viruses, fungal diseases and insects. Therefore, RIPs have enormously potential applications in medicine and agriculture.

RIPs widely exist in higher plants, they have a rich polymorphism in the same plant. The polymorphism of RIPs is important in searching the origin of RIPs, besides, polymorphism is of high significance in the research of RIPs function.

Bolongnesi etc. isolated a ribosome-inactivating protein from *Bougainvillea spectabilis* Willd in 1997, named Bouganin. Researchs have shown that Bouganin not only had the N-glycosidase activity, it also had a striking feature that it had a very low toxicity to animal cells and individuals, it's the lowest toxic RIP at present.

According to our findings of researches on *B. glabra* Choisy in these years, we found its *bouganin* gene had a high polymorphism, so we speculated that there can be a polymorphism in it's bouganin protein. For this reason, we chose *B. glabra* Choisy as a material, amplified its RIP homology sequence and expressed the recombinant protein. After preparing the antibody of recombinant bouganin, we explored the separation and purification way of bouganin in *B. glabra* Choisy by affinity chromatography. We hope our research can set the stage for separation and purification of polymorphic bouganin. Our main results and conclusions are as follows:

1. Connected the cloned *Bouganin* fragment and pET-28a vector, constructed the recombinant expresseion vector, pET-28a-bouganin, and imported it into BL21(DE3), then we obtained recombinant bouganin proteins induced by IPTG. The optimal inducing condition of the recombinant protein was 18°C, 160-180rpm for 10h.

2. The recombinant bouganin had a different inhibition degrees on tumor cells of HepG-2, Hela and B-16 which  $IC_{50}$  are 873.9  $\mu$ g/ml, 562.6  $\mu$ g/ml and 624.5  $\mu$ g/ml respectively. Inhibition of the recombinant bouganin on tumor cells showed that bouganin had a higher application value on medical science.
3. We made the polyclonal antibody using recombinant bouganin proteins as antigens. ELISA test showed the antibody titer reached 1:3200, so we calculated its affinity constant of  $5.8 \times 10^6$ , this figure was slightly lower than the claimed value of  $10^7$ - $10^{12}$ .
4. Coupling the antibodies and CNBr-activated Sepharose 4B gel to make a affinity column, then the bouganin proteins in *B. glabra* Choisy was separated by this column. But it was regrettable that our experiments didn't get bouganin in this process. We analysed this failure maybe come from 2 reasons: low antibody titer and bouganin content in extracting solution, they reduced the affinity efficiency to a great degree. To confirm our speculation, we loaded the recombinant bouganin proteins to chromatographic column as control. A little of total sample can be gathered, while most of the sample cannot adsorb to affinity. This result can provided a basis for our speculation

**Keywords:** *Bougainvillea spectabilis* Choisy, ribosome-inactivating protein, affinity chromatography

## 第一章 前言

### 1 核糖体失活蛋白的研究概况

#### 1.1 RIP 的研究历史

核糖体失活蛋白 (Ribosome-inactivating protein, RIP) 是一类广泛存在于高等植物细胞中的能专门作用于真核细胞并损伤其核糖体功能的毒蛋白, 具有对病毒、真菌和昆虫的广谱抗性。研究者已经开展了对 RIP 基因工程和蛋白质工程的研究, 对 RIP 的结构和功能的研究与改造可更大限度的发挥 RIP 的功能, 目前 RIPs 在植物基因工程和医学研究中已取得有意义的进展, 有的已转化为应用成果为人类服务。

核糖体失活蛋白的发现最早可追溯到 1887 年, Dixon 认为蓖麻子中存在一种蛋白质, 这种蛋白是使蓖麻子具有毒性的原因; 随后 Stillmark 纯化了这种蛋白, 把它命名为 ricin, 蓖麻子的毒性是由于 ricin 对红细胞的凝集作用; 1891 年 Hellin 纯化了 abrin, 发现它也具有凝集活性。到本世纪 60 年代, Lin 等发现这些毒素对腹水癌细胞的毒性比对正常细胞的大, 人们对它们投入了更多的兴趣, 随着研究的深入, 发现这两个毒素为双链结构, 两条肽链发挥不同功能, 使它们具有失活核糖体、抑制蛋白质生物合成的特性。此后, 又陆续发现了一些别的核糖体失活蛋白。首个被发现的双链核糖体失活蛋白是美洲商陆蛋白 (Pokeweed antiviral protein, PAP), 它是从一个美洲商陆的叶子里纯化出来的具有抗病毒感染的双链蛋白。我国科学家发现, 被失活的核糖体在无细胞体系中的蛋白质翻译活力可以被硼氢化钠或者氨基酸部分地恢复活力<sup>[1]</sup>。

1987 年 Endo 等揭示了 RIP 的作用机理<sup>[2]</sup>。Endo 等发现当 RIPs 作用于真核细胞时, 能够专一地脱去一个腺嘌呤碱基, 从而使核糖体失活, 即它们具有 RNA N-糖苷酶活性。蓖麻毒蛋白 (ricin) 是第一个从植物中分离得到的对核糖体蛋白翻译具有强烈抑制作用的蛋白, 随后在其他植物及真菌和藻类中也发现这类蛋白的存在, 但其主要存在于高等植物中。到目前为止, 人们已从被子植物纲的 18 种单子叶植物和 122 种双子叶植物中分离到了 RIPs<sup>[3]</sup>。

由于分子生物学技术的飞速发展，加之医药科学的不断完善，核糖体失活蛋白的研究具有极其重要的意义。RIPs 不仅是研究核糖体结构与功能的重要工具，还是研究核糖体动态翻译机制中拓扑结构及 rRNA 催化功能的分子探针。另一方面，由于 RIPs 以庞大的同源蛋白家族形式存在于植物界，常作为植物分子系统学和蛋白质分子进化研究的分子指标。RIPs 具有广谱的植物病毒抗性和抵抗多种植物病原真菌及农业害虫的活性，在植物保护上具有广阔的应用前景；在医学上也可用来开发免疫毒素、流产药物、抗 AIDs 和抗肿瘤等药物，因此有着良好的潜在应用前景。

## 1.2 RIPs 的分类与分布

### 1.2.1 RIPs 的分类及基本特性

根据 RIPs 的结构特性，可以将核糖体失活蛋白分为 3 类：I 型、II 型和 III 型。

I 型 RIPs 是单肽链蛋白，分子量约为 26-32kDa，一般为碱性糖蛋白，pI 在 8-10 之间，十分稳定，具有 RNA N-糖苷酶活性，在活性位点区域内具有高度保守的活性裂隙残基和二级结构。I 型 RIPs 在植物体中首先以无活性的前体蛋白-蛋白原（proprotein）形式存在，然后经过一个相对简单的加工过程而成为成熟蛋白<sup>[4, 5]</sup>。原蛋白中含有一信号肽，该信号肽序列不仅具有指导蛋白质定位的功能，还具有保护作用，即前体蛋白质由于具有信号肽，不能抑制核糖体活性，从而使植物自身蛋白合成过程受到保护。Ready 等曾报美洲商陆抗病毒蛋白首先以无毒性前体形式合成，然后在信号肽指导下，被运至叶肉细胞基质中才最终成为有活性的毒蛋白<sup>[6]</sup>。I 型 RIPs 没有细胞结合位点，因此不能穿透正常细胞的细胞膜，而只对那些主动摄取外源物质的细胞如滋养层细胞和癌细胞有毒性。单链 RIP 对无细胞体系的蛋白质合成有强烈抑制作用，IC<sub>50</sub> 大都在 1nM 以下，对完整细胞毒性却很低，IC<sub>50</sub> 常常达数千 nM，对小鼠的 IC<sub>50</sub> 常为几到几十 mg/kg，故又称为“半毒素”（hemitoxin）。大多数核糖体失活蛋白为 I 型，如天花粉蛋白（Trichosanthin, TCS）、美洲商陆抗病毒蛋白（Pokeweed antiviral protein, PAP）、肥皂草素（Saporin）、丝瓜毒蛋白（Luffin）、大麦翻译抑制剂（Barley Translational Repressor, BTR）、麻疯树核糖体失活蛋白（Curcin）等。

II 型 RIP 是异构二聚体, 分子量约为 62 kDa, 含两个分子量相近的亚基, 即 A 链和 B 链, 它们通过一对二硫键相连, pI 值在 4.8-8 之间, 偏酸性, 不稳定<sup>[7]</sup>。II 型 RIPs 也有个加工成熟的过程, 它首先以无活性的单链蛋白-前蛋白原 (pre-proprotein) 形式被合成, 信号肽被切除后仍为无活性单链前体蛋白-原蛋白。只有单把内切酶水解掉中间十几个氨基酸 (如蓖麻毒蛋白中为 12 个) 后, 才形成由 A、B 两条链组成的真正毒蛋白<sup>[8]</sup>。由于 II 型 RIP 在初始合成时无活性, 因此植物可安全的进行其自身蛋白质合成, 只有当前原蛋白被运送至目的地, 其 C-末端信号肽被切除后, 才具有毒性。A、B 链拆开后, A 链变得很不稳定, 此时 A 链具有 RNA N-糖苷酶活性, 可通过修饰真核细胞或原核细胞核糖体大亚基而抑制蛋白质生物合成, 终止蛋白的合成, 称为毒素链。B 链有两个糖基化位点, 可结合 D-半乳糖, 称为结合链。A 链含糖量较 B 链少 (如 ricin A 链只有一个糖基化位点, 含糖量只有 B 链的 30% 左右), 有的甚至不含糖 (如 abrin A 链), 将重组 A 链基因在 *Escherichia coli* 中表达, 发现糖基化对它的催化活性不是必需的。完整双链 RIP 对无细胞体系蛋白质生物合成的抑制活性较低,  $IC_{50}$  大都为数十 nM, 但若将 A、B 链间的二硫键打开后, 其活性会大大提高<sup>[9]</sup>。双链 RIP 对完整细胞毒性很高,  $IC_{50}$  大都低于  $10^{-2}$  nM, 故又称为细胞毒素 (cytotoxin)。B 链不仅具有细胞识别功能, 还能协同 A 链进入细胞, 定位于高尔基体。研究表明链间的断裂是启动 A 链活性的关键, 这一过程由高尔基体的蛋白二硫键氧化还原酶催化完成。在无细胞体系中, 双链 RIP 的活性较低, 可能是 B 链的存在妨碍了 A 链的活性<sup>[9, 10]</sup>。II 型的 RIP 仅在 6 科 8 种植物中发现, 如蓖麻毒蛋白、相思子毒蛋白 (abrin) 及辛纳毒蛋白。还有一些 RIP 由 4 条多肽链组成, 实际上它们是由两个相同的双链 RIP 通过次级键结合在一起的二聚体, 性质与双链 RIP 相同, 如 Ricin 由两个完全相同的异源二聚体通过非共价键连接而成四聚体。

III 型 RIP 也是一条多肽链, 合成时以无活性的前体形式出现, 当活性位点氨基酸中间的二硫键以及 C-末端和 N-末端的扩展序列被水解掉以后, III 型 RIPs 才能够具有活性, 此类型并不常见。到目前为止, 仅在玉米 (*Zea mays*) 和大麦 (*Hordeum vulgare*) 中鉴定出 III 型 RIPs。在玉米中的 RIP 前体是酸性蛋白, 它被从内部切割释放出氨基酸, 产生带有氨基端和羧基端的片段, 这一加工导致 2 条多肽链亚基的产生, 分别为 16.5kD 与 8.5kD, 在玉米中发现的两种 RIP 都属

于III型 RIPs。在大麦中，一个是 I 型，另一个是III型。由于III型 RIPs 与 I 型 RIPs 有相似性，因此也可将 RIPs 按有无 B 链将 RIPs 分为两类，即 I 型和 II 型<sup>[11]</sup>。

II 型 RIP 的 A 链和 I 型 RIPs 一般由 210-270 个氨基酸组成，同源性的为 17%-75%<sup>[12]</sup>。虽然 RIPs 的一级结构同源性不大，但空间结构十分相似，RNA N-糖苷酶活性位点的位置也很相似<sup>[13]</sup>。有人提出一种假设，认为 II 型核糖体失活蛋白是由一个 I 型核糖体失活蛋白的古老基因同一个凝集素基因发生融合而来的。

由上可知，I、II 型 RIPs 最大的差别是 II 型 RIPs 具有一结合链，可以结合细胞表面的 D-半乳糖，协助 A 链进入细胞，整个过程通过受体调节的内吞作用完成。当其进入高尔基体时，两链间的二硫键被蛋白二硫还原酶打开。独立的 A 链此时具有极强的毒性，可以阻止蛋白合成，全过程皆为酶所催化，因此效率极高。I 型 RIPs 无结合区，不能与细胞结合，不易进入细胞内部，因此对蛋白质合成的抑制效果较差，可以说 I 型具细胞外毒性，而 II 型则具细胞内毒性，且其毒性较强，在低浓度时即具有致死性，仅一个蓖麻毒蛋白分子即足以杀死一个细胞<sup>[14]</sup>。

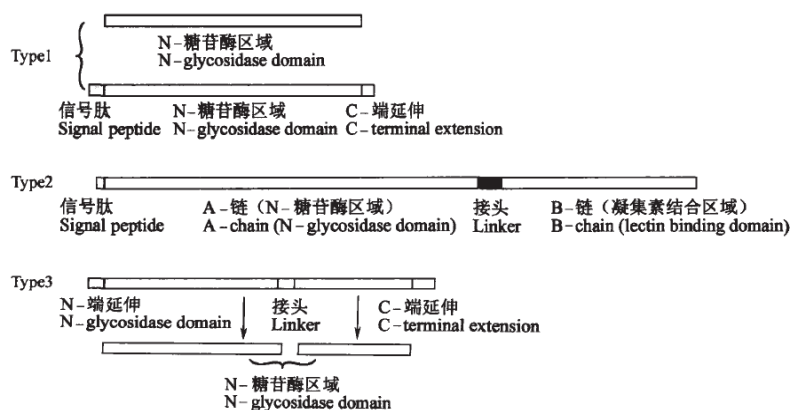


图 1.1 核糖体失活蛋白的类型<sup>[15]</sup>

Fig1.1 Types of Ribosome-inactivating Protein

## 1.2.2 RIPs 的分布

### 1.2.2.1 RIPs 在自然界中的分布

RIPs 广泛存在于高等植物中，目前还没有从裸子植物中发现 RIP。迄今为止

已经从 350 余种植物中筛选到 110 多种 RIPs<sup>[16]</sup>。人们分离到的 RIPs 大多为 I 型 RIPs, 广泛存在于多种植物中, 如葫芦科、石竹科、禾本科、商陆科、蓼科、百合科等植物, 且不同植物不同器官含量差异很大。II 型 RIPs 仅在大戟科、蚕豆、西番莲科、忍冬科、毛茛科、桑寄生科、鸢尾科和樟科的一些植物中报道过。有些植物中同时存在有 I 型和 II 型 RIPs, 大戟科和樟科是同时存在两种类型 RIPs 的家族。其中, 樟科植物中的核糖体失活蛋白是由我国科学家发现的, 荷兰鸢尾 (*Iris hollandica*) 中至少存在两种 II 型 RIPs (Iris agglutinin b 和 Iris agglutinin r) 和一种 I 型 RIPs<sup>[17]</sup>。

目前报道的 RIPs 少数来源于真菌和细菌。细菌 RIPs 的报道很少, 常见的有志贺菌 (*Shigella dysenteriae*) 产生的志贺毒素 (Shiga toxin) 以及大肠杆菌 0157: H7 菌株产生的类志贺毒素 (Shiga-like toxin)<sup>[18]</sup>。目前真菌中报道的 RIPs 均为 I 型单链, 分子量一般小于 20 kDa, 大多数编码基因尚未被克隆。已经从霉菌类 (*Aspergillus*) 分离到 a-sarcin, clavin, mitogillin 和 restrictocin 等 RIPs。近年来, 也报道了不少的 RIPs 来自食用菌, 如 volvarin, flammulin, velutin, pleuturigin, hypsin 和 lyophyllin。此外, 一种土生真菌 *Trichoderma viride* 中也报道具有 RIPs。

#### 1.2.2.2 RIPs 在植物组织器官和细胞中的分布

石竹类植物 (*Dianthus sinensis*) 的花、叶、根、以及茎秆中均有 RIPs 的分布, 其中以叶片中的含量最为丰富<sup>[19]</sup>。辛纳毒蛋白 (cinnamomin) 只存在于香樟种子中, 无法从叶片和成熟的果肉中分离到<sup>[20]</sup>。多数情况下, 同一植物不同组织, 甚至同一组织中同时存在有几种不同的 RIPs, 如肥皂草的叶子中含有肥皂草素 L1、L2; 根中含有肥皂草素 R1、R2、R3; 种子中含有肥皂草素 S5、S6、S8、S9; 春季的美洲商陆叶中含有商陆抗病毒蛋白 (pokeweed antiviral Protein, PAP), 夏季叶中含有商陆抗病毒蛋白-II (PAP-II), 种子中含有商陆抗病毒蛋白-S (PAP-S); 小麦种子中含有小麦毒蛋白-S (tritin-S), 叶子中含有小麦毒蛋白-1 (tritin-1)。另外, 在同种植物的不同组织中得到的 RIP 活性也不尽相同, 比如在 *Mirabilis jalapa* L. 各组织的 RIPs 中, 种子中的酶活性最高, 其次是花蕾, 未成熟的种子, 以及叶子, 根, 而在其他的组织中酶活性普遍较低。有人从美洲商陆的叶子、根、种子中纯化出几种核糖体失活蛋白, 发现它们彼此之间相似又不



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库